

CONSIDERACIONES SOBRE LA DIAGÉNESIS Y VELOCIDAD DE RACEMIZACIÓN DE AMINOÁCIDOS DE FÓSILES DEL CUATERNARIO

T. de Torres, P. García-Alonso, J. Llamas Borrajo, L.Canoira López.

Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas, Ríos Rosas 21, 28003 Madrid.

RESUMEN

En este trabajo se describen las alteraciones de los contenidos en aminoácidos de fósiles del Cuaternario, que resulta ser dependiente del tiempo. También se citan algunos casos en los que se ha podido determinar diferencias en la velocidad de la reacción de racemización de los aminoácidos que es como sigue: gasteropodos> operculos> pelecipodos> ostracodos.

ABSTRACT

This paper deals on a description of Quaternary fossils amino acid contain variations, a diagenetic time depending process, and a general analysis of spontaneous amino acid racemization reaction velocity which could be described as follows: gastropoda > opercula > pelecipoda > ostracoda.

Introducción.

En los seres vivos, con algunas excepciones, sólo existen L-aminoácidos, cuando sobreviene su muerte, comienza una reacción química denominada racemización, según la cual los L-aminoácidos se transforman en D-aminoácidos. Dicha reacción sigue una cinética reversible de primer orden, hasta que se alcanza el estado racémico en el que la relación D/L es 1. La isoleucina posee dos átomos de carbono con enlaces asimétricos; en este caso la reacción de transformación se denomina epimerización, produciéndose la evolución de L-isoleucina a D-alloisoleucina.

La cinética de este proceso viene dada por la ecuación:

$$\ln \left(\frac{1+D/L}{1-D/L} \right) - C = (1+K') K_L t^{1/2}$$

- (D/L): relación entre los enantiómeros del aminoácido en cuestión
- C: factor que representa la racemización que introduce el método experimental
- t: el tiempo
- K_L : es la constante de equilibrio de la reacción de racemización
- $K' = K_D/K_L$

A partir de los valores D/L, conocidos mediante análisis, se puede emplear este proceso para calcular edades numéricas.

La relación D/L se obtiene a partir de análisis de la muestra mediante cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrometría de masas (MS) y algunos autores emplean analizadores de aminoácidos, especialmente para la isoleucina.

Las constantes de la reacción K_L y K_D se han llegado a conocer mediante estudios de cinética de racemización en laboratorio, Wehmiller y Belknap (1982), Rutter y Vlahos (1988) y, Goodfriend y Meyer (1991).

Por lo tanto parece sencillo realizar el cálculo de edad numérica. Desgraciadamente la solución del cálculo de edades no parece estar tan al alcance de la mano como aparenta, ya que existen un buen número de factores geoquímicos que afectan a la velocidad de racemización de los aminoácidos y, por lo tanto, al cálculo de edades. Un factor fundamental es la historia térmica del punto del que se han recogido las muestras. Si se trata de un medio susceptible de haber permanecido en una relativa isoterminia p.e. fondos marinos o lacustres que nunca emergieron, cuevas profundas, no presenta grandes dificultades. Si se pueden presentar problemas cuando se analiza material procedente de terrazas marinas o fluviales, generalmente emergidas desde su deposición y, por lo tanto, sometidas a las oscilaciones térmicas del Cuaternario. Ello obliga a la obtención de "modelos locales de cinética", que precisan de un calibrado previo mediante el análisis de muestras datadas por métodos radiométricos.

Otro aspecto importante radica en la posible diagénesis que sufren los aminoácidos durante el tiempo geológico, así como las diferentes velocidades de racemización de los aminoácidos de diferentes grupos o géneros zoológicos. Una puesta al día de estos procesos va a constituir el objetivo central de esta comunicación.

En el laboratorio de datación por análisis de racemización de aminoácidos de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas de Madrid, se emplea un método de preparación de muestras basado en el descrito por Goodfriend (1991), con ligeras modificaciones, Meyer (com. pers.).

Las muestras

Los materiales objeto de análisis provienen de las localidades siguientes:

Sedimentos marinos de Cuesta Colorada (EL Ejido, Almería). Se trata de depósitos marinos, playas, que se han atribuido al tránsito Plioceno/Pleistoceno, aunque podrían ser más

recientes, Torres et al. (1997). Los restos analizados corresponden a pelecípodos (*Pecten* sp. *Chlamys* sp. *Amussium* sp. *Lopha* sp. Ostreido indet) y braquiópodos (*Terebratula* sp.).

- Depósitos lacustres de Venta Micena (Orce, Granada) con abundantes restos de gasterópodos continentales (*Bithynia* sp., *Lymnaea* sp., *Planorbis* sp. fragmentos indeterminados y opérculos de cf. *Bithynia* sp.). Estos materiales han sido datados mediante análisis de racemización de aminoácidos, cf. Torres et al. (1997) en circa 1 ma).
- Pelecípodos (*Cardium* sp.) y gasterópodos (murícidos) de una playa fósil de Oyambre en Cantabria, Garzón et al. (1996), cuyo desarrollo tuvo lugar a finales del gran último interglaciar (90 ka aprox.).
- Pelecípodos de la playa actual de Punta Umbria, Huelva (*Anomia* sp. *Chlamys* sp.); pelecípodos (*Pecten* sp., *Glycymeris* sp., *Cardium* sp. y *Panopaea* sp.) de una barra litoral de la desembocadura del río Guadiana de edad holocena (entre 2235 y 2175 BP según datación por ¹⁴C, Zazo et al. (1993)); pelecípodos y gasterópodos de un sondeo "off shore" cuya edad estaría cerca del límite Pleistoceno-Holoceno (ca. 10 ka, Somoza com. pers.).

Los materiales se recogieron con medios estériles y se guardaron en bolsas de plástico de un sólo uso. En laboratorio se limpiaron de adherencias por medios mecánicos: punzón, fresa de sinter de diamante etc. Finalmente se limpiaron con HCl 2N, y con peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

Posteriormente las muestras sufrieron un tratamiento químico con el fin de liberar los aminoácidos: se eliminó la matriz carbonatada recogiendo las proteínas, dichas proteínas se hidrolizaron para obtener los aminoácidos que las componen, que fueron transformados en compuestos volátiles mediante derivatización, y se analizaron.

El primer paso de la preparación química consistió en la eliminación de la matriz carbonatada e hidrólisis de los aminoácidos contenidos en ella, mediante un ataque con HCl 12N (2.9 µl/mg). Tras homogeneizar con 100 µl de HCl 6N, se calentó a (100 °C) durante 20 h en tubos de ensayo rellenos de nitrógeno con tapones roscables forrados de Teflón. A continuación, se transfirió la muestra a viales Eppendorf de 1.5 ml y mediante la adición de HF concentrado (1.25 µl) se desalinizó. La disolución se centrifugó, separándose el sobrenadante, que contiene los aminoácidos, desechando el precipitado. El reactivo en exceso (HCl y HF) se eliminó congelando la muestra en nitrógeno líquido y evaporando en vacío (6 h). Posteriormente se añadieron 80 µl de agua ultrapura para transferir la muestra a viales de vidrio, tras lo cual se evaporó el agua.

Para realizar la primera derivatización se adicionaron 250 μ l de disolución 3M de cloruro de tionilo SOCl_2 , (CECAL) grado analítico, en alcohol isopropílico (grado HPLC). Los viales se cerraron bajo atmósfera de N_2 y se llevaron a calentamiento (100 °C) durante 1 h, tras el cual se evaporó el reactivo sobrante (30 min) en vacío. En la segunda derivatización se añadieron 200 μ l de anhídrido trifluoroacético (grado analítico) disuelto en cloruro de metileno (1:3) de grado espectroscópico. Se cerraron los viales bajo atmósfera de N_2 y se calentaron a 100 °C durante 5 min, y por último, se evaporó el reactivo sobrante a sequedad bajo vacío o bajo corriente de Ar, ya que los aminoácidos, en este momento, se encuentran en forma de compuestos volátiles. La muestra se preparó para su análisis cromatográfico disolviéndola en 50 μ l (FID) o 100 μ l (NPD) de n-hexano (grado HPLC). Para su análisis se inyectó en un cromatógrafo de gases HP5890, usando He como gas portador, columna Chirasil L-Val de 25 m y detector FID o NPD.

Fenómenos relacionados con la diagénesis.

Tras la muerte del animal comienza el proceso de racemización, y simultáneamente comenzará la descomposición de las partes blandas; posteriormente se producirá una hidrólisis espontánea de las proteínas y la liberación de aminoácidos. Posiblemente servirán como base alimentaria de organismos inferiores. En la Fig.-1 se han representado las áreas de los picos del ácido aspártico (D+L) de las muestras procedentes del Golfo de Cádiz. Estas áreas, se trata de una escala arbitraria, representan de manera semicuantitativa la cantidad de ácido aspártico presente en las muestras, que desciende rápidamente en el lapso de unos dos mil años que separan las muestras de la playa actual de las de la "Barra Holocena". La cantidad de ácido aspártico disminuye muy notablemente en los materiales del sondeo "off shore", pese a que estaban en un ambiente reductor y protegidos del aire. el descenso es especialmente marcado en los gasterópodos que tienen conchas aragoníticas.

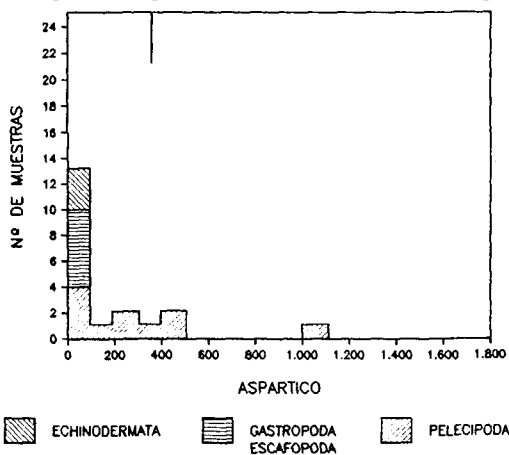


Fig.-1. Histograma del área de los picos del ácido aspártico en las muestras del Golfo de Cádiz.

Una cuestión que se plantea inmediatamente es la influencia de la diagénesis en la preservación de las relaciones D/L. De acuerdo con la experiencia de nuestro laboratorio, en una serie de experimentos en los que se analizó el comportamiento de muestras artificiales preparadas a partir de patrones, eluyéndolas y filtrándolas repetidas veces por columnas de sílice o Dowex, las relaciones se mantienen. En la naturaleza, por lo tanto, cabe pensar que el proceso se mantiene. Por otra parte, dado que la racemización sigue una cinética parabólica, Fig.-2, es fácil suponer dada la gran pendiente de la parte inicial de la curva, que rápidamente aparecen cantidades importantes de D-aminoácidos, que garantizan la preservación de las relaciones D/L a lo largo de la historia de racemización de los fósiles.

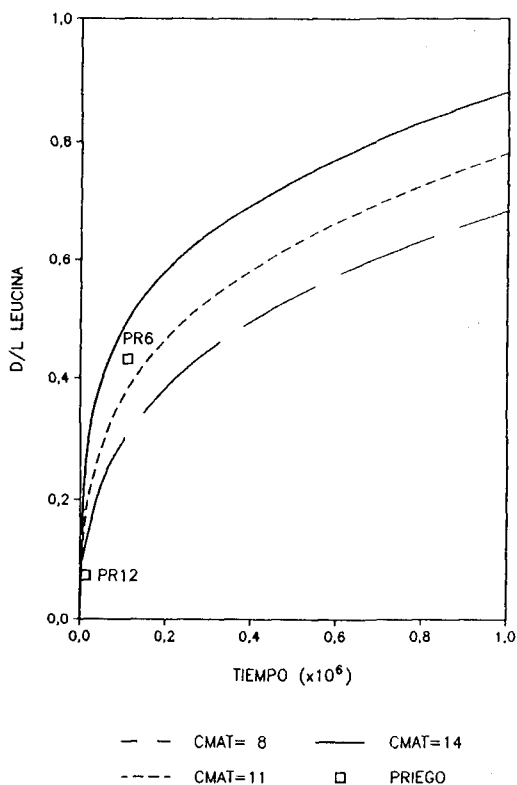


Fig.-2. Curvas cinéticas de la leucina para diferentes CMAT.

La racemización de acuerdo con el phylum y género zoológico de la muestra.

Cuando se comenzaron los análisis sistemáticos de muestras de diversos grupos, el primer problema que encontramos fue que se manifestaba una falta de coherencia de resultados, ya que las muestras de gasterópodos aparecían mucho más racemizadas que las

de pelecípodos. Ello originaba que las edades numéricas que proporcionaban los pelecípodos eran netamente inferiores, mas bajas, que las que se derivaban del análisis de gasterópodos.

Los histogramas de los grados de racemización de varios aminoácidos: leucina, ácido aspártico, fenilalanina y ácido glutámico de muestras procedentes de un sondeo "off shore" del Golfo de Cádiz, Fig.-3, con una edad cercana a 10 ka, pone de manifiesto que los aminoácidos de las conchas de gasterópodos, racemizan netamente más rápido que los de pelecípodos. Curiosamente este fenómeno, que afecta a todos los aminoácidos, lo hace de forma mas marcada en el ácido aspártico (un aminoácido que racemiza muy rápidamente a inicios del proceso, y en la fenilalanina, un aminoácido "lento" que racemiza de manera mas pausada que el ácido aspártico. Estas muestras corresponden, fundamentalmente, a ejemplares muy juveniles de pelecípodos (*Glycymeris* sp. *Tellina* sp., *Cardium* sp.) y gasterópodos (*Turritella* sp.).

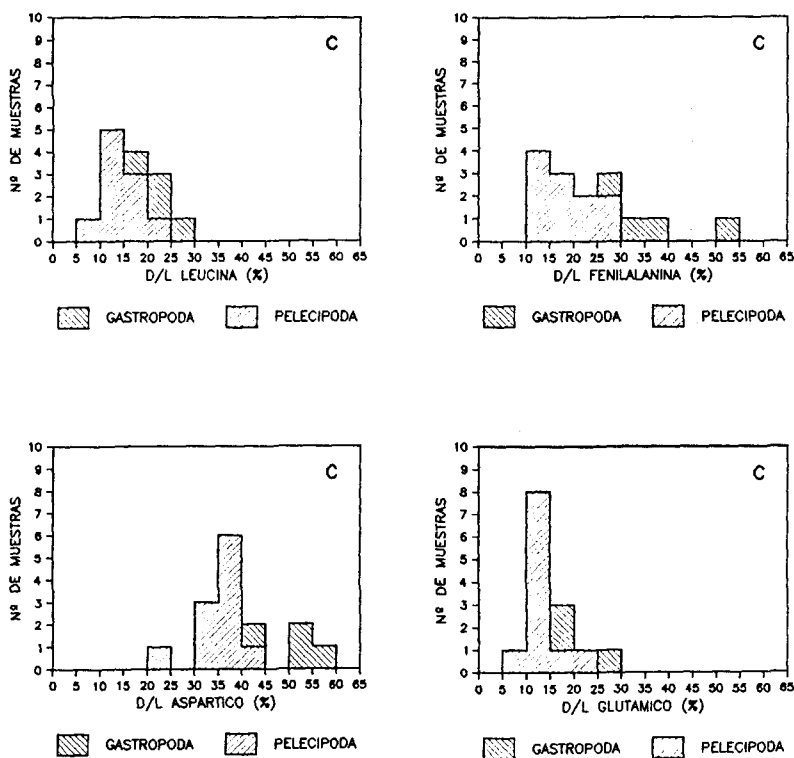


Fig.-3. Histogramas de la leucina,ac. aspártico, fenilalanina y ac. glutámico de las muestras de un sondeo "off shore" en el Golfo de Cádiz.

Un estudio sistemático de la racemización de los aminoácidos en braquiópodos y pelecípodos de unos niveles antiguos, atribuidos al Plioceno terminal de Cuesta Colorada (Almería), cf. Torres et al. (1997), revela, Fig.-4, que existe bastante homogeneidad en el grado de racemización de los pectínidos (*Chlamys* sp., *Pecten* sp., *Amussium* sp.) muy comunes en el registro paleontológico, mientras que en los ostreidos (*Lopha* sp.) y braquiópodos (*Terebratula ampulla*).

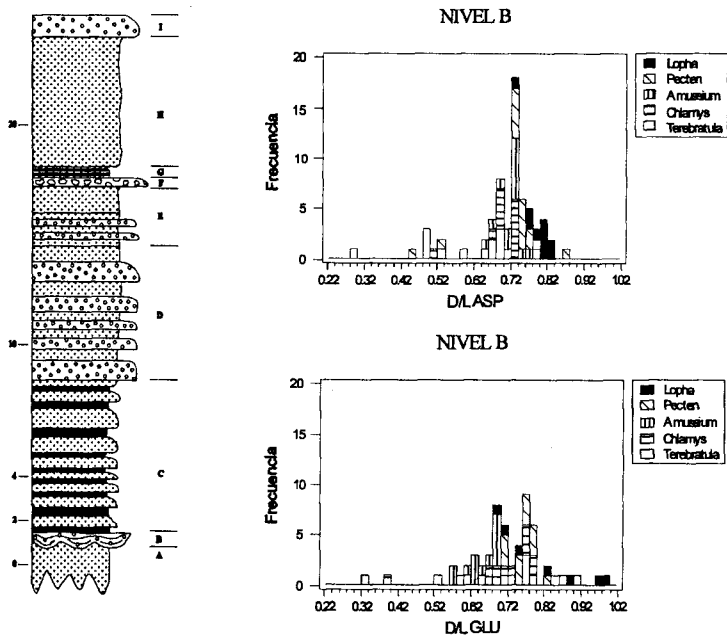


Fig.-4. Histogramas de relaciones de racemización en braquiópodos y pelecípodos de Cuesta Colorada (Almería)

Actualmente se está trabajando intensamente en la datación de los materiales pleistocenos de la cuenca de Guadix-Baza, sector de Baza y se han realizado abundantes análisis de muestras que han permitido datar algunos yacimientos paleontológicos clásicos, cf. Torres et al. (1997). En ellos se pone de manifiesto que existe una gradación creciente del grado de racemización de los aminoácidos según se trata de una muestra tomada sobre pelecípodos, gasterópodos u opérculos de gasterópodo. Posteriormente se han analizado muestras procedentes de caparazones de ostrácodos (crustáceos) con la sorpresa de encontrar que presentan notables ventajas ya que no solamente tienen mayores concentraciones de aminoácidos (se usan 10 mg en

ha datado en ca. 1 ma, cf. Torres et al. (1997). Sólo se han analizado tres muestras de ostrácodos.

	Leucina	A. Aspártico	Fenilalanina	A. Glutámico
Opercula	0.89+-0.03	0.89+-0.02	0.89+-0.1	0.84+-0.3
Gastropoda	0.88+-0.04	0.80+-0.02	0.71+-0.04	0.61+-0.03
Ostracoda	0.84-0.85	0.63-0.66	0.79-0.81	0.58-0.60

Conclusiones

Se confirma la necesidad de contar con un amplio banco de datos de análisis, que permita comparar los valores de racemización obtenidos para muestras de los mismos géneros zoológicos. Cuando hay discrepancias con los modelos de velocidades de racemización definidos, habría que pensar que se ha producido una mezcla de restos fósiles, como podría ocurrir en la playa fósil del último interglaciar de Oyambre (Cantabria), cf. Garzón et al. (1996).

BIBLIOGRAFÍA

- Garzón, G. Alonso, A. Torres, T. Llamas, J. (1996): Edad de las playas colgadas y de las turberas de Oyambre y Merón (Cantabria). Geogaceta 20 (2):498-501.
- Goodfriend G.A. (1987): Chronostratigraphic studies of Sediments in the Negev Desert, Using Amino Acid Epimerization Analysis of Land Snail Shells. Quat. Res. 28, 374-392.
- Goodfriend G.A. and Meyer V. (1991): A comparative study of the kinetics of amino acid racemization/epimerization in fossil and modern mollusk shells. Geochim. Cosmochim. Acta 55, 293-302.
- Hare P.E. (1969): Geochemistry of proteins, peptides and amino acids. In Organic geochemistry; Methods and results (Edited by Eglinton G. and Murphy M.T.J.)pp 438-463. New York Springer Verlag.
- Torres, T. Canoira, L. Coello, F.J. García-Alonso, P. García-Cortés, A. Llamas, J. Mansilla, H. Nestares, Peláez, A. Somoza, L. (1995c): Caracterización geoquímica (orgánica) de los moluscos holocenos del Golfo de Cádiz (Andalucía, España). Geogaceta 19: 150-153.
- Torres, T. García-Alonso, P. Canoira, L. Llamas, J. Coello, F. J. García-González, L. Nestares, T. Peláez, A. Rodríguez-Alto, N. (1997): Racemización de los aminoácidos de braquiópodos y pelecípodos de la sección de Cuesta Colorada (Almería, SE de España). Geogaceta 20 (en prensa)
- Torres, T. Llamas, J. Canoira, L. García-Alonso, P. García-Cortés, A. Mansilla, H. (1997): Amino Acid Chronology of the Lower Pleistocene Deposits of Venta Micena (Orce, Granada, Andalousie, Spain). Org. Geochem. 26: 85-97.
- Wehmler J.F. and Belknap D.F. (1978): Alternative kinetic models for the interpretation of amino acid enantiomeric ratios in Pleistocene molluscs: Examples for California, Washington and Florida. Quat. Res. 9:330-348.